Prix Gobley
1899 (1)

Concours

pour le prix Gobley.

1899.

M. Montier.

Etude, sur la Recherche de l'Oxydase ou Ferment oxydant, chez les Végétaux.

par M. Mansier Pharmacien de l'Ecole Supre de Paris
ancien Interne des Hopitaux de Paris
Lauréat de la Société de Pharmacie de Paris
(à Gannat - Allier)

La question de présence des ferments oxydants chez les végétaux, quoique nouvelle a déjà été sérieusement examinée depuis quelques années.

Schœnbein avait fait connaître les réactions caractéristiques de principes oxydants qu'il supposait appartenir à la Classe des Ferments Solubles; puis un chimiste Japonais, au nom quelque peu rébarbatif Hikorokuro Yoshida découvrit en 1883, un ferment dans le suc de l'arbre à laque. En 1894, Monsieur G. Bertrand dans une belle étude sur le même sujet, arriva à approfondir les mystères de l'obtention de la laque, en démontrant qu'elle résultait de l'action d'un ferment, la laccase, sur un phénol spécial, le laccol. Puis M. Bourquelot en collaboration avec M. Bertrand, reconnut que la laccase n'existait pas seulement dans le suc de l'arbre à laque, mais que sa présence était corrélative du changement de coloration, survenant dans un grand nombre de phanérogames ou de champignons, lorsque les tissus de ces végétaux étaient mis en contact avec l'air.

Une liste des quelques plantes d'où la laccase avait été extraite, fut même publiée dans les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, de 1895.

Dans un travail très complet publié dans le Journal de Pharmacie et de Chimie, concernant l'action de cette oxydase sur les monophénols, polyphénols et leurs dérivés, Mr Bourquelot vient de traiter la partie chimique des réactions relatives à ce genre d'oxydation fermentaire, avec tout le soin auquel nous a habitués le savant professeur.

Plus récemment, en décembre 1898, M.M. Brissemoret et Joanne démontraient que le ferment digitalique isolé en 1895 par Kosmann n'était autre qu'une oxydase. En janvier 1899. M. L. Lépinois publiait une note sur la présence de ferments oxydants contenus dans l'Aconit et la Belladone. Et au mois de Mai dernier, M. Vadam faisait connaître à la Société de Pharmacie de Paris, qu'il avait rencontré un ferment oxydant chez l'Hellébore fétide.

Je dois ajouter qu'en 1896. M. Bertrand a trouvé dans les tissus des tubercules de Dahlia, de pommes de terre, la Betterave, une oxydase qu'il a cru devoir différencier de la laccase, et à laquelle il a donné le nom de tyrosinase, en raison de son action sur la tyrosine, qu'elle seule, parviendrait à oxyder.

Les connaissances concernant ce sujet, commencent donc à prendre consistance et nul doute que d'ici quelques années, il n'arrive à être épuisé; ~~tant il~~ paraît interessant et tant est grand le besoin d'élucider les points encore obscurs. C'est précisément cette curiosité qui m'a poussé à faire quelques observations dont je relaterai ici les résultats.

Il m'a semblé impossible que seuls quelques végétaux privilégiés soient en possession d'un ferment certainement physiologique qui devait aider à la formation de principes nécessaires à leur nutrition. Et de même que toutes les semences sont pourvues de diastase indispensable à la solubilisation des matières amylacées, de même l'oxydase devait se rencontrer chez tous les végétaux. Ce ferment devait être continuellement sécrété, depuis les premiers moments de l'existence de la plante, c'est-à-dire dès que la graine passe de l'état latent à l'état actif et jusqu'au terme de sa vie.

Ces essais ont commencé par la mise en germination de quarante sortes de graines appartenant à différentes familles botaniques et qui avaient été préalablement soumises à l'épreuve de la teinture de résine de Gayac. (Ce réactif a été choisi par les savants expérimentateurs qui se sont occupés de ce genre d'oxydations, d'abord parce que l'acide gayaconique est extrêmement oxydable et ensuite, parce que la coloration bleue qu'il prend sous l'influence du ferment permet de discerner facilement, l'intensité du pouvoir oxydant, par la nuance plus ou moins foncée que ce réactif y développe). ~~et qui se~~

Quelques unes de ces graines ont eu une réaction assez marquée sur la teinture de gayac; mais pour la plupart, elles n'opèrent aucun changement de coloration. Ces semences ont été examinées, matin et soir pendant leur germination pour bien surprendre le moment précis où le ferment se révèlerait dans les graines

n'oxydant pas déjà le gayac avant d'avoir été mises dans les conditions capables de réveiller leur vitalité.
Quelques unes ont présenté dès le gonflement que détermine chez elles l'humidité, les caractères de l'oxydase; d'autres, beaucoup plus nombreuses ont attendu la sortie de la radicule. Enfin quelques autres, même après le développement parfait de la plantule, n'ont fourni aucune réaction de présence de ce ferment.
Parmi les semences bleuissant facilement le gayac, pendant la germination, il faut citer celles fournies par les plantes appartenant aux Synanthérées, aux Labiées, aux Solanées, puis aux Ombellifères, aux Légumineuses, et enfin, d'une façon beaucoup moins intense, aux Graminées. Pour ces dernières il a fallu même souvent procéder à un essai par comparaison.
Chez toutes ces plantules, le bleuissement du gayac se fait indifféremment sur toutes leurs parties isolées: radicule, tigelle, cotylédons, seul l'albumen reste sans effet sur le réactif.
Les Crucifères, les Liliacées, au contraire, donnent des plantules sans action colorée sur le gayac.
En considérant les familles dont les semences en germant, ne donnent pas la réaction de l'oxydase, l'idée me vint que peut-être ce ferment soluble serait sécrété par des microbes répandus d'abord à la surface des grains puis se développant pendant la germination, dans tous les tissus. L'activité des infiniment petits pourrait être détruite par la présence des huiles essentielles renfermées dans les embryons de quelques unes de ces plantes.
Des ensemencements faits dans un milieu

absolument aseptique, avec des graines ayant subi des lavages plus ou moins prolongés dans une solution de bi-chlorure de mercure ont donné naissance à des plantules ne différant en aucune façon, de celles qui étaient venues sans aucun soin.

Tous ces essais ayant été faits à l'étuve, l'hiver, ont été renouvelés au printemps, de façon à pouvoir suivre comparativement leur végétation en plein air et à l'obscurité.

On a pu alors observer que chez certaines plantes (trèfle, luzerne, sainfoin, arachide, pois cultivé, vesce, gesse, chanvre, orge, seigle, avoine, etc.) la réaction ~~qui~~ bleue qui se manifestait assez aisément par le gayac, après le développement des cotylédons, perdait, par la suite, en végétant à la lumière, tout caractère permettant d'affirmer la présence de l'Oxydase. Au contraire, les mêmes plantes, venues à l'obscurité, d'une végétation chétive, continuaient à révéler les caractères du ferment soluble, souvent avec plus d'intensité qu'au moment de la germination. Ces végétaux, habitués peu à peu à vivre à la lumière ont perdu insensiblement la faculté de colorer le gayac. On s'est assuré que la présence de la chlorophylle, chez les individus dont la croissance s'était effectuée à l'air libre ne devait pas être mise en cause, en ajoutant aux essais faits avec les végétaux venus à l'obscurité, une dissolution éthérée de chlorophylle empruntée à une plante poussée normalement.

Or, on sait qu'on arrive facilement à augmenter chez les végétaux la proportion d'asparagine simplement en les faisant croître dans un endroit obscur. Il est donc logique d'admettre que les principes chimiques qui arrivent à se former, chez les végétaux suivant qu'on les oblige à vivre

d'une façon plus ou moins anormale, sont capables de rendre évidentes, les manifestations colorées qui caractérisent le ferment oxydant.

Mieux que cela, l'oxydase serait aussi exister chez les végétaux ayant poussé dans les conditions ordinaires ; j'en ai acquis la certitude en isolant cette oxydase par l'alcool concentré, et les réactions colorées obtenues par la teinture de gayac, les solutions de gayacol, d'hydroquinone, de pyrogallol, quoique peu intenses, étaient comparables à celles de l'oxydase provenant de végétaux donnant des réactions manifestes.

Comme M.M. Bourquelot et Bertrand l'ont signalé, les ferments oxydants isolés ont perdu la plus grande partie de leur pouvoir, les réactions colorées qu'elles déterminent sont beaucoup plus faibles et beaucoup plus longues à se montrer. Cet affaiblissement du pouvoir diastasique est comparable à celui de l'amylase.

Si on fait deux essais de saccharification, l'un sur un nombre déterminé de grains d'orge germée, l'autre avec la diastase obtenue du même nombre de grains, par plusieurs précipitations à l'alcool, on observe que les grains non traités ont un pouvoir liquéfiant et saccharifiant beaucoup plus étendu que la diastase retirée des mêmes grains. Et on sait depuis longtemps que cette action sur l'amidon s'atténue et arrive même à s'éteindre au fur et à mesure qu'on multiplie les précipitations.

L'oxydase, du reste, n'est pas complètement insoluble dans l'alcool ; les plantes qui possèdent les caractères manifestes de sa présence, la conservent même dans l'alcool. C'est ainsi que l'alcoolature d'aconit préparée depuis deux ans.

précipité encore, après addition d'eau, la teinture de gayac.

Il existe néanmoins quelques espèces, chez lesquelles, au contraire, la réaction bleue est plus manifeste lorsqu'elles viennent en pleine lumière que lorsqu'elles végètent à l'obscurité. Si l'on compare des tiges de haricots venues, les unes à la lumière vive, les autres, dans un endroit ne laissant passer que quelques rayons diffus, on constate que la tige étiolée ne bleuit pas, même après 1/4 d'heure d'attente tandis que la plante développée normalement bleuit d'abord un peu, et si on n'ajoute le réactif qu'une demi-heure après le broyage, l'intensité de la nuance augmente sensiblement. On peut remarquer aussi, si la plante n'a pas été bien mise en pulpe, que ce sont les vaisseaux qui sont le plus vivement colorés. Par contre, la racine des mêmes plantes venues à l'obscurité bleuit plus vite et dans un temps moins long.
Comme on l'a répété à maintes reprises, tous ces essais doivent être faits, sans l'intervention de l'~~oxy~~ eau oxygénée.

Ces résultats consignés, plusieurs herborisations m'ont permis de cueillir des plantes dont le nombre a dépassé 300 et appartenant à des familles très variées.
A l'arrivée de l'excursion, ces plantes étaient examinées dans toutes leurs parties, racines, tiges, feuilles, fleurs ou fruits, par les réactifs habituels, et il était pris note d'une part, de celles qui donnaient une coloration et de l'autre de celles qui n'en fournissaient pas.
Plus de la moitié des végétaux récoltés ont été classés dans la première catégorie, suivant qu'ils accusaient une teinte dans leur ensemble ou dans une de leurs parties.
De même que pour les graines mises en germination il a été constaté que toutes les plantes fournies par les Synanthérées bleuissaient énergiquement et rapidement le gayac

et de plus, qu'elles oxydaient la tyrosine obtenue, soit de la fève, comme l'a fait connaître M. Bourquelot, soit par digestion pancréatique de la fibrine, comme l'a publié tout dernièrement M. V. Harlay.

La famille des Labiées a présenté dans sa presque totalité des plantes ayant aussi les caractères oxydants des Synanthérées.

Parmi les Rosacées, les tribus des Fragariées, des Prunées, des Potériées, des Rosées ne présentent pas les caractères du ferment oxydant, probablement parce que leurs tissus sont gorgés de tannin; par contre les Pirées les présentent, avec action sur la tyrosine.

La plus grande partie des Ombellifères, des Renonculacées, des Solanées, des Malvacées, Cariophyllées, Violariées, Caprifoliacées, Papavéracées, Convolvulacées, bleuissaient aussi, plus ou moins énergiquement, la teinture de gayac.

Dans les familles à Oxydase non manifeste, on peut ranger : les Crucifères, Résédacées, Crassulacées, Saxifragées, Euphorbiacées, Liliacées.

Pendant ces nombreux essais, il a été souvent noté que bien des plantes, qui aussitôt après la trituration ne donnaient aucun caractère oxydant en fournissaient, si la teinture de Gayac ne leur était ajoutée qu'un quart d'heure ou une demi-heure après qu'elles avaient été broyées. Telles sont : Malva rotundifolia (feuilles) Urtica urens (feuilles) Rumex patientia (racines) oxalis acetosella (racines) Vinca minor (racines) Cerasus vulgaris (pulpe).

La réciprocité s'est aussi rencontrée quelques fois. C'est ainsi que dans la famille des Synanthérées qui possède comme je l'ai expliqué, des propriétés extrêmement ~~oxydants~~, la laitue renferme dans le parenchyme central

de son collet, des substances qui entravent la mise en évidence de l'Oxydase. Si on fait une coupe verticale à ce niveau et qu'on la triture, le bleuissement se trouve déjà fort atténué, et si on attend un quart d'heure avant l'addition du réactif, la coloration ne se manifeste plus.

Il semble donc rationnel d'admettre que dans beaucoup de plantes, il existe des principes beaucoup plus avides d'oxygène que ne le sont, le gayac ou la tyrosine.

On peut du reste, se rendre compte d'une réaction de ce genre, par l'essai suivant : on introduit dans deux tubes à essais des volumes égaux d'eau acidulée de quelques gouttes d'acide chlorhydrique. Dans l'un d'eux, on ajoute une petite quantité de tanin (0gr,01 par exemple), on laisse ensuite tomber dans chacun d'eux, V gouttes de teint. de gayac et à l'aide d'une pipette on fait écouler le long des parois du tube, le même nombre de gouttes de solution de permanganate de potasse à 2 gr par litre. Dès les premières gouttes, la solution ne renfermant que l'eau acidulée offre une coloration bleue franche qui prend de l'intensité après chaque addition de permanganate. La solution de tanin, au contraire, verdit légèrement et ne change plus de teinte jusqu'à ce que la totalité du tanin soit oxydée, après quoi, seulement, la coloration se développe dans ce tube comme dans le premier.

De même, il suffit d'additionner la pulpe d'une plante à oxydase manifeste, d'une quantité plus ou moins grande, suivant le cas, de pulpe d'une autre plante ne paraissant pas renfermer de ferment, pour diminuer sensiblement l'intensité de la teinte qu'elle offrait par le gayac et même l'annihiler

complètement.

Il n'est même souvent, pas nécessaire d'avoir recours à l'addition d'une substance étrangère pour masquer la réaction du ferment : les sucs des Synanthérées et des Ombellifères, par exemple, ne donnent plus de coloration si les réactifs ne leur sont ajoutés que cinq à six heures après que les plantes ont été broyées.

C'est ici le lieu de signaler quelques petites observations relatives à ce qui a été dit ;

Chez deux plantes, aux genres extrêmement voisins : le poirier et le pommier, il se présente les différences suivantes. Tandis que chez le premier, toutes les parties aériennes, sans exception, possèdent à un haut point, les caractères évidents de la présence du ferment, au contraire, chez le pommier, les bourgeons, les pédoncules, les feuilles ne donnent aucune coloration et cependant les pistils bleuissent énergiquement. Les pétales ne donnent pas de coloration immédiate ou du moins elle est très atténuée, mais si on attend une demi-heure avant d'ajouter le réactif, la manifestation colorée est aussi vigoureuse qu'avec les fleurs de poirier. J'ajouterai que toutes les variétés de poirier et de pommier présentent exactement cette même particularité. –

Le suc de la jeune poire, conservé par le chloroforme bleuit encore le gayac, après huit jours. alors que le suc de pommes ne bleuit plus. –

– Chez deux variétés de la même plante, le lilas (Syringa vulgaris) à fleurs blanches et à fleurs lilas, la variété blanche possède des pétales ne se colorant qu'au bout de dix minutes alors que la variété lilas donne une ~~teinte~~ immédiate.

– Dans le Lamium album, la fleur se colore ~~immédiat~~ de suite et avec énergie, la tige se teinte moins vite et avec

moins d'intensité, la feuille qui renferme beaucoup d'un tannin spécial, ne bleuit pas.

De ce que la manifestation colorée ne se produit pas, il ne s'en suit donc pas que la plante ne possède pas d'oxydase ou que son pouvoir fermentaire soit éteint. La raison en est qu'il s'y rencontre des principes plus oxydables que ne le sont les réactifs, et si ces principes ne s'y trouvent qu'en faible proportion, la réaction colorée pourra encore se produire, mais seulement lorsqu'ils auront été complètement oxydés ou qu'ils auront fait place à un produit transitoire moins oxydable.

L'excès d'acidité est, chez les végétaux une cause qui s'oppose souvent à ce qu'ils bleuissent par le gayac. Les Ribes et les Rumex sont dans ce cas, mais il ne suffit pas de saturer cette acidité pour voir la réaction s'opérer. Cependant le pouvoir oxydant du ferment soluble n'est pas ~~éteint~~, comme il le serait par les acides minéraux, comme je le montrerai plus loin. Les acides organiques sont eux-mêmes oxydés et si leur proportion dans le suc des végétaux est très limitée, les réactifs pourront déceler le ferment, après leur disparition par oxydation.

Les Cerises offrent, pendant leur maturité, un exemple naturel qui permettra de vérifier cette assertion. On peut ainsi, en comparant leurs différentes variétés de fruits, doux, semi-aigres et aigres se rendre compte ~~de la teneur~~ l'influence de leur teneur en acide. La cerise douce, bleuit énergiquement le gayac, la Cerise aigre n'offre qu'une réaction extrêmement atténuée qui cependant augmente par la maturation, la variété semi-aigre occupe comme intensité de coloration, le second rang.

— Les premiers bourgeons qui se montrent sur la vigne, encore très peu acides bleuissent un peu le gayac.

dans le Liber, les feuilles qui viendront, étant plus acides ne donneront plus de Coloration.
On rencontre aussi quelques variétés de pommes qui ne donnent par le gayac qu'une Coloration très faible, ces pommes sont toujours très âcres et doivent renfermer une forte proportion d'acide mallique.

Comme preuve à l'appui de la proposition que j'émets, que même les végétaux ne présentant pas de Coloration par les réactifs, renferment de l'Oxydase, j'ajouterai qu'un grand nombre de ceux-ci, broyés et traités à différentes reprises par l'Ether qu'on décante ensuite, offrent alors une pulpe qui bleuit avec intensité la teint. de gayac. Les racines du radis rose (raphanus sativus) le péricarpe vert de l'amande (amygdalis Communis) les turions d'Asperges (Asparagus officinalis) les fruits et semences du pois cultivé (pisum Sativum) du haricot (phaseolus vulgaris) le mésocarpe de l'orange (citrus aurantium), peuvent être choisis pour la vérification de ces faits. —
Cependant, je ne dirai pas que toutes les plantes de cette catégorie soient après ce traitement, le démasquer leur réaction colorée. Pour cela il faudrait un dissolvant, non miscible à l'eau, qui permît d'enlever aux végétaux, les principes qui entravent la manifestation de la présence de l'oxydase, Ce dissolvant ne pourrait être que l'Ether, le Chloroforme, le sulfure de Carbone ou un carbure d'hydrogène. Or, d'une façon générale, ces principes ne sont autres que des acides organiques, des tannins, des amides, glutamine, Leucine, corps solubles dans l'eau, mais peu ou pas solubles dans les liquides cités.
L'Ether, dans les expériences faites n'a guère dû enlever aux pulpes que les huiles essentielles, et quelques glucosides ou alcaloïdes.

Indépendamment de l'essai des réactifs plus ou moins aptes à absorber l'oxygène que le ferment met à leur disposition, il importait de connaître comment devaient se comporter ces différents végétaux broyés, par rapport à ce gaz.

Il est admis, en effet, que le signe caractéristique de l'Oxydase, qui doit lever tout doute, est une absorption d'oxygène. Et pour vérifier cette absorption, on place la plante réduite en pulpe, avec un peu de Chloroforme, pour assurer sa conservation, dans un flacon d'assez grande capacité et dont l'ouverture est fermée d'un bouchon perforé qui donne passage à un tube effilé. Après une expérience de cinq à six jours, pendant lesquels on agite de temps à autre, l'extrémité du tube est brisée sous l'eau. Or ce moyen n'est pas exempt de tout reproche, car si on ne prend pas la précaution de n'effiler le tube de verre qu'après le montage de l'appareil, il arrive que la compression de l'air, provoquée par la mise en place du bouchon est suffisante pour contrebalancer une légère diminution de pression. D'un autre côté, la chaleur de la main, pendant qu'on maintient le flacon incliné sous l'eau, pour en briser le bout du tube, peut dilater le gaz intérieur, et prêter ainsi à une erreur.

Pour éclaircir ce phénomène d'absorption, j'ai expérimenté sur 40 végétaux, pris indistinctement parmi ceux chez qui l'oxydase était évidente ou ne se manifestait pas.

Ceux-ci broyés, étaient introduits, avec un peu d'eau Chloroformée, de façon à former une pâte molle, facilement déplaçable, dans un flacon bouché d'un caoutchouc perforé, à travers lequel passait un tube de verre, deux fois recourbé, et dont l'extrémité venait plonger dans un second flacon d'eau communiquant avec l'extérieur. Une bandelette de papier était collée

verticalement sur le flacon, en regard du tube adducteur. Les flacons étaient placés dans un endroit à température sensiblement constante, de manière à éviter toute erreur relative à la dilatation.

Matin et soir, le niveau de l'eau dans ce tube était examiné en faisant passer un rayon visuel horizontal et inscrit sur la bandelette.

Ces observations ont duré quinze jours.

Les quelques graphiques ci-dessous, parmi ceux que j'ai pris montreront facilement les changements de pression qui s'opèrent sous l'influence du ferment oxydant.

N°	Sujet	Marques (de haut en bas)
1	Fève (plante entière)	2, 3, 1, 9, 6, 8, 7, 5, 10
2	Gomme arab. (solution)	8, 9, 7, 6, 1, 5, 4, 3, 2
3	Sureau fleurs	10, 9, 4, 8, 7, 6, 2 & 5, 1, 3
4	Pomme de terre (jeune pousse)	7, 6, 1, 5, 2, 3 & 4
5	Chélidoine (plante ent.)	8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1
6	Adonis vernalis (plante ent.)	3, 2, 4, 1, 5, 8, 7, 10, 6, 9
7	Asperge (turion)	10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1
8	Radis (rameau)	8, 7, 3, 2, 1, 4, 5, 6
9	Groseilles à grappes (fruits)	8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1
10	poirier (jeune fruit)	2, 8, 1, 7, 6, 5, 9, 3, 4
11	pommier (jeune fruit)	8, 6, 4, 5, 7, 1, 2, 3
12	œillet blanc (fleur)	3, 2, 1, 7, 6, 5, 4
13	œillet lilas (fleur)	2, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8
14	pivoine (fleur)	8, 7, 6, 5, 1, 2, 3, 4
15	raifort (feuilles)	10, 8, 9, 7, 6, 5, 2, 1, 3, 4
16	Pomme de terre (jeune plante) avec addition de 1% acide citrique	14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 1, 2, 3, 4.5.6
17	Marasmius Oreades	8, 1, 2, 9, 7, 6, 3, 4, 5

Comme on peut le voir, si quelquefois, par exemple chez les fruits de groseilles, les turions d'Asperges, la Chélidoine (plante entière) la marche de l'absorption ~~était~~ absolument régulière, le plus souvent, l'ascension du liquide, dans le tube était oscillante et accompagnée d'alternatives de diminution de pression.

Dans bien des cas, comme dans les jeunes pousses de pommes de terre, la pivoine, la fève, la marche descendante était au contraire régulière. Le gaz émis, cause de la dépression était chez tous les végétaux examinés, l'acide carbonique, absorbable par l'eau de chaux ou l'eau de baryte.

Des essais comparatifs faits avec les mêmes végétaux préalablement soumis à une ébullition d'un quart d'heure avec un peu d'eau, ont montré que souvent aussi, il y avait absorption d'oxygène, mais extrêmement lente et la plupart du temps, la pression restait sensiblement la même, pendant toute la durée de l'expérience. De même, les changements de coloration qui se produisaient avant l'action de la chaleur, chez un grand nombre d'entre eux, cessaient après l'ébullition. Seule, la fève, (plante entière) a continué de noircir +. Il existe donc, M. Bourquelot l'a déjà fait savoir, en dehors de la tyrosine, un autre chromogène ~~oxydable~~ dans cette plante, principe éminemment oxydable qui n'a pas besoin du concours de l'oxydase.

Ces ~~faits~~ procédés à marche descendante anormale peuvent s'expliquer de la façon suivante : le principe oxydable, pendant le broyage a déjà fixé l'oxygène et le dégagement de C^2O^4 a lieu dans l'appareil lui-même. Parfois, cette fixation se fait d'une façon incomplète et alors le dégagement d'acide carbonique est suivi d'une nouvelle absorption d'oxygène, c'est ce qui doit se passer le plus souvent.

La fin de la dépression peut coïncider, avec la formation d'un principe défini, intermédiaire entre le produit primitif existant et celui qui doit mettre terme à la réaction oxydante.

Il n'existe, sous le rapport de l'absorption d'Oxygène, aucune différence entre les végétaux bleuissant la teint. de Gayac et ceux qui ne produisent pas de réaction colorée, pas plus qu'il n'en existe entre les plantes dont l'oxydase se borne apparemment à la production du bleu de Gayac et celles dont la puissance va jusqu'à l'oxydation de la tyrosine.

Examinons maintenant, le cas de l'existence de deux ferments à pouvoirs oxydants différents, correspondants à la Laccase et à la Tyrosinase.

Il est vrai que les végétaux, en possession pendant leur vie, d'un ferment agissant sur la tyrosine, conservent, même après leur dessiccation, quoique d'une façon extrêmement lente, la faculté d'oxyder celle-ci, mais il est facile d'expliquer cela par la non formation de principes oxydables, à partir de la récolte du végétal, et pendant une dessiccation normale.

Deux moyens se présentent d'éclaircir ces faits; le premier consiste à enlever aux sucs végétaux sans action sur la tyrosine, les matières oxydables qui s'opposent à cette réaction. Le second à chercher à détruire ce pouvoir chez les végétaux ~~oxydant~~ la tyrosine, en ajoutant à leur suc, le suc d'autres plantes ne bleuissant pas le gayac ou ne le bleuissant que faiblement.

Le premier moyen est d'une application impossible, les matières ~~solubles~~ oxydables n'étant guère solubles que dans l'eau, le deuxième pourra donc, seul, être utilisé

Si donc, au suc d'une racine de Synanthérée, possédant comme le suc de Russula, la propriété de noircir la tyrosine, on ajoute un volume égal de pulpe de jeune plante de Seigle ou de Ers lentille, l'action tyrosinique se trouvera considérablement atténuée et en augmentant la proportion de ces mêmes sucs, on arrivera à la faire disparaître totalement, le mélange se bornant à bleuir la teinture de Gayac, comme le ferait le suc seul d'une de ces dernières plantes. On peut aussi faire une épreuve en se servant de pulpe de racine de Radis, sans action colorée avec les réactifs. Là encore, le gayac donne une teinte bleuâtre, mais l'action sur la tyrosine se trouve complètement annihilée.

Dans les plantes à tyrosinase, de même que dans celles à laccase, il existe certains organes ne donnant pas ou ne donnant pas ~~immédiatement~~ sur le champ la réaction colorée. Beaucoup de fleurs sont, en particulier, dans ce cas. Les fleurons ou demi-fleurons du Calendula arvensis ~~n'ag~~ du Bellis perennis n'agissent pas immédiatement sur la tyrosine. Il est nécessaire pour obtenir la manifestation colorée d'attendre un quart d'heure avant l'addition du réactif; cependant pour le Calendula, le noircissement ~~se~~ fait aussitôt si on opère sur les fleurons encore verts, c'est-à-dire avant l'épanouissement de la fleur.

La Mercurialis annua présente une racine qui ne noircit également la tyrosine qu'au bout d'un certain temps. Cette plante renferme un chromogène bleu dans le parenchyme cortical de la tige et de la racine, plus apparent ~~surtout~~ dans cette dernière, en raison de l'absence de chlorophylle, qui doit se développer surtout sous l'influence du ferment oxydant.

Tous les principes chimiques paraissant entraver l'activité de la laccase, agissent de même sur celle de la tyrosinase : acide tartrique, citrique, malique, gallique, tannins.

La tyrosine étant d'une oxydation plus difficile que l'acide gayaconique, a besoin de toute l'activité de l'oxydase et pour cela il est nécessaire, ~~et pour~~ qu'elle ne se trouve pas chez les végétaux, avec lesquels on la met en contact comme réactif, des produits également susceptibles de subir des modifications par oxydation.

Dès, comment admettre, si l'on s'en tient aux manifestations colorées, que certaines russules ne renfermant pas de tyrosine, possèdent ~~un~~ ferment spécial à cette oxydation, alors que la Fève (Faba vulgaris) ne donne même pas de réaction avec le gayac.

D'un autre côté, nous avons vu que les expériences sur l'absorption d'oxygène ne permettaient pas de supposer pareille distinction. —

Quant à la localisation de l'Oxydase chez les phanérogames, ce ferment ~~ne~~ se rencontre non seulement dans le parenchyme, comme M. Lépinois et M. Raciborski l'ont trouvé dans l'Aconit, la Belladone et la Canne à sucre, mais encore dans les vaisseaux des faisceaux fibro-vasculaires et dans les laticifères.

Ces expériences n'ont porté seulement que sur les phanérogames, mais j'ai tenu incidemment à appliquer les données acquises à la recherche de l'Oxydase chez les Champignons. A la vérité, un seul essai a été fait, et c'est le Marasmius Oreades qui en a été le sujet. Les espèces du genre Marasmius essayées par M.M. Bourquelot et Bertrand ont toutes été considérées comme ne renfermant pas d'oxydase, parce qu'elles donnaient pas de réaction avec le gayac. Cependant l'absorption d'oxygène est chez ce Champignon, comme je l'ai figuré plus haut, en tous points conforme à celle des végétaux chlorophylliens

De plus, il se fait rapidement en quelques jours, une coloration noire qui pourrait bien avoir ~~comme Chromogène~~ la tyrosine, comme point de départ. La présence d'un ferment soluble oxydant semble donc évidente.

M. Bourquelot, puis MM. Brissemoret et Joanne ont constaté que certains végétaux à réaction oxydante manifeste, conservaient longtemps après la cueillette cette propriété. On peut très bien concevoir, en effet, que chez les plantes ne renfermant pas de principes très oxydables l'oxydase puisse conserver son pouvoir manifeste sur la tyrosine ou le gayac ; au contraire chez celles renfermant des matières à oxydation facile, les propriétés du ferment arrivent à s'éteindre totalement.

Le ferment oxydant existant dans tous les végétaux et dans tous leurs organes à toutes les périodes de la vie, quel doit être son rôle ? J'estime qu'il remplit une action physiologique commune à tous, sans exception et que son but est un apport plus facile de l'élément comburant de l'air sur les principes organiques des végétaux propres à s'oxyder.

Ces principes sont de nature bien variée : les albuminoïdes, des alcaloïdes, glucosides, des amides, des phénols, des acides organiques, des ~~huiles~~ matières grasses même, car bien qu'on ait supposé chez les semences huileuses, l'existence d'un ferment capable de saponifier les graisses, la présence de la glycérine n'a encore jamais été constatée, pas plus durant la germination que pendant les premiers temps de la vie du végétal. Il est aussi simple de prévoir leur transformation par oxydation à partir de la matière grasse elle-même qu'à partir des acides gras qui la composent. On peut, du reste, pendant la germination de la graine de lin, constater que l'huile qu'on en extrait à l'aide de l'éther est beaucoup plus épaisse que celle obtenue de la graine non germée et qu'elle a déjà fixé de l'oxygène. —

Il est à croire que l'oxydase apporte son influence sur la maturité des fruits cueillis encore verts, et aide

à la transformation des acides organiques en Glucose ; le travail N° 16 aiguës des gaz propriétés montre en effet, que l'acidité du moins, telle qu'elle se rencontre chez les végétaux, n'entrave pas l'action du ferment et n'agit que momentanément sur la manifestation colorée qu'elle supprime, mais l'acide étant complètement oxydé l'action oxydante pourra encore se porter sur les réactifs.

On peut supposer aussi que pendant la dessiccation des plantes certains Glucosides ou alcaloïdes subissent des métamorphoses ; on sait en effet, que la racine verte de Grenadier présente des propriétés vermifuges beaucoup plus énergiques, lorsqu'elle est verte que lorsqu'elle a subi la dessiccation.
De même on sait que quelques ~~beaucoup de~~ semences exigent pour germer, souvent des années, et il est permis de penser qu'une oxydation des principes albuminoïdes est nécessaire, en même temps que l'humidité, pour mener à leur l'achèvement de ~~leur~~ leur constitution chimique.

En résumé, j'ai acquis par mes expériences, la certitude que l'Oxydase existe chez tous les phanérogames, dans tous leurs organes, et à toutes les périodes de la vie.
J'ajouterai que je crois pouvoir étendre, par analogie, mes déductions, à tous les végétaux, sans exception.
Il n'y a pas lieu de former plusieurs classes de ferments oxydants, basées sur leur différence d'action, en présence de la tyrosine : l'intensité de la manifestation colorée étant soit totalement annihilée, soit simplement atténuée par la présence de produits plus oxydables que ceux qui servent de réactifs. —

Marthansiez